

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian pembuatan bioetanol dari pati biji durian akan dilakukan di Laboratorium Teknobiologi Industri, Fakultas Tenobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Waktu penelitian akan dilakukan pada bulan Mei 2016 – Agustus 2016, dengan urutan waktu dan kegiatan penelitian sesuai dengan Lampiran 1.

#### B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau, talenan, baskom, *petridish*, pH meter, corong, erlenmeyer, pipet tetes, propipet, pipet ukur, *laminair air flow*, ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkubator, timbangan elektrik, arloji, kertas label, blender, spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu pharmaspec 18000 UV-VIS*), *autoclave*, oven, neraca analitik, pemanas, panci, penyaring / pengayak 80 *mesh*, cawan Conway, alat destilasi, magnetik stirrer, alat *colony counter*, dan *shaker* inkubator, vorteks, *hot plate stirrer*, kertas saring, *handcounter*, ayakan, *aluminium foil*, tabung *Durham*, jarum enten, botol plastic 250 mL, dan selang karet diameter 0,5 cm.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji durian (*Durio zibethinus* Murr.) yang diperoleh dari kegiatan usaha terkait buah durian yang ada di kota Yogyakarta. Kultur *Zymomonas mobilis* strain FNCC-5506 diperoleh dari Pusat Studi Bioteknologi PAU UGM. Bahan lainnya adalah  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , DNS, Na-K Tartarat, NaOH (Merck),  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  fenol kristal, natrium sulfat, asam asetat, Na-asetat, larutan, *Ziehl Neelsen* (Zn) A, larutan Zn B, larutan

Zn C, larutan laktofenol, larutan NaOH, HCL, spritus, alkohol 70%, reagen Arsenomolibdat, reagen Nelson A, Nelson B, etanol (p.a), pereaksi Anthrone, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, larutan gram (A, B, C, dan D), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\alpha$ -naftalamin, asam sulfanilat, reagen *Kovac's*, glukasa monohidrat enzim amylase ( $\alpha$ -amylase dan glucoamylase) merk Suntaq, medium *Nutrient agar* (NA).

### C. Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini akan dilakukan dengan 2 tahap percobaan dengan. Tahap pertama merupakan tahap hidrolisis pati menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor variasi konsentrasi pati biji durian (2, 3, 4, 5 dan 6 %) dengan menggunakan enzim (alpha amilase dan glucoamilase) dengan 3 kali ulangan tiap perlakuan (Tabel 5).

Tabel 5. Rancangan Percobaan untuk Hidrolisis Pati Biji Durian menggunakan enzim *alpha-amilase* dan *glukoamilase* dengan Variasi Kadar Pati Biji Durian

No.	Hidrolisis	Konsentrasi pati biji durian				
		2% (K)	3% (L)	4% (M)	5% (N)	6% (O)
1	Pemanasan	K <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
2	$\alpha$ -amylase	K <sub>2</sub>	L <sub>2</sub>	M <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
3	Glukoamylase	K <sub>3</sub>	L <sub>3</sub>	M <sub>3</sub>	N <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>

Tahap kedua merupakan fermentasi etanol oleh *Zymomonas mobilis* menggunakan medium hasil hidrolisis dengan kadar gula pereduksi tertinggi menggunakan Rancangan Acak Lengkap seperti pada Tabel 5. Tahap fermentasi dilakukan dengan perlakuan konsentrasi starter yaitu 10% (v/v) dan waktu fermentasi yaitu 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 hari. Konsentrasi starter dan waktu fermentasi

dengan tiga kali pengulangan digunakan untuk mendapatkan konsentrasi starter dan waktu fermentasi optimum dalam pembuatan bioetanol dari pati biji durian menggunakan *Zymomonas mobilis*.

Tabel 6. Rancangan percobaan fermentasi bioetanol dari pati biji durian

Konsentrasi Pati biji durian	Waktu Fermentasi				
	1 hari	2 hari	3 hari	4 hari	5 hari
Kontrol	CH <sub>1</sub>	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>4</sub>	CH <sub>5</sub>
2 %	KH <sub>1</sub>	KH <sub>2</sub>	KH <sub>3</sub>	KH <sub>4</sub>	KH <sub>5</sub>
3 %	LH <sub>1</sub>	LH <sub>2</sub>	LH <sub>3</sub>	LH <sub>4</sub>	LH <sub>5</sub>
4 %	MH <sub>1</sub>	MH <sub>2</sub>	MH <sub>3</sub>	MH <sub>4</sub>	MH <sub>5</sub>
5 %	NH <sub>1</sub>	NH <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>	NH <sub>5</sub>
6 %	OH <sub>1</sub>	OH <sub>2</sub>	OH <sub>3</sub>	OH <sub>4</sub>	OH <sub>5</sub>

#### D. Cara Kerja

1. Preparasi biji durian (Surraya dan Sukandar, 2008; De Idris, dkk., 2012; Kusumaningati, dkk., 2013 dengan modifikasi).

Biji durian dibersihkan dan ditiriskan, kemudian dipisahkan dari daging buah biji durian. Biji durian diiris tipis dan dijemur pada panas matahari hingga kering (2-3 hari). Irisan biji durian kering digiling menggunakan penggilingan tepung beras atau blender, selanjutnya diayak dengan ayakan tepung konvensional hingga diperoleh bubuk biji durian dan disimpan di tempat kering. Bubuk biji durian ditambahkan air dengan perbandingan 1:5 (b/v) sambil dilakukan peremasan, diaduk, dan kemudian dibiarkan sampai 12 jam. Lendir pada larutan tepung biji durian dicuci dengan air sebanyak 3 kali. Larutan tepung biji durian disaring dengan kain penyaring (kain panel) dan selanjutnya diendapkan selama 12-24 jam. Endapan yang terbentuk dijemur hingga kering, dihaluskan

menggunakan blender dan disaring menggunakan ayakan 80 mesh hingga diperoleh tepung pati biji durian. Pengolahan pati biji durian secara skema dapat dilihat pada Lampiran 3. Rendemen pati biji durian dihitung dengan persamaan:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{b}{a} \times 100\%$$

Keterangan: a = Bubuk biji durian awal (g) dan  
b = berat pati biji durian

2. Penentuan kadar air dan kadar pati, gula reduksi dan total karbohidrat pati biji durian.

a. Analisis kadar air (AOAC, 1995).

Cawan Petri dikeringkan dalam oven (100-105 °C) selama ± 1 jam, lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang (A). Sebanyak 3 g pati biji durian (B) dimasukkan ke dalam cawan petri dan dipanaskan dalam oven (100-105 °C) selama ± 2 jam, kemudian didinginkan selama 60 menit dalam desikator dan ditimbang (C). Kadar air dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(A+B)-C}{C} \times 100\%.$$

b. Analisis kadar pati / total karbohidrat (AOAC, 1984; Apriantono dkk.,1989).

Pati biji durian sebanyak 3 g dilarutkan dengan etanol 95% pada suhu 40 °C, kemudian disaring dengan kertas saring dan dioven pada suhu 80 °C. Sampel yang telah dioven ditimbang sebanyak 0,1 g dan dilarutkan dalam 5 mL DMSO (*dimetil sulfoksida*). Sampel diletakkan di atas penangas air mendidih (suhu 80 °C) selama 20 menit sambil sesekali divortex, didinginkan dalam ruangan dan disentrifus selama 20 menit, kemudian diambil

supernatannya. Endapan yang tersisa ditambah lagi dengan 5 mL DMSO dan disentrifus kembali (proses diulang hingga tiga kali). Supernatan yang diperoleh dikumpulkan dalam gelas ukur 50 mL, diencerkan 10 kali kemudian divortex dan diuji kadar gula totalnya dengan metode *Anthrone*.

Penentuan kadar pati dinyatakan sebagai gula pada filtrat. Gula hasil *digest* dianalisis dengan larutan *Anthrone* (pati yang terhidrolisa bersama dengan gula-gula yang larut direaksikan dengan *Anthrone* (0,1%) dalam asam sulfat pekat), dan akan menghasilkan warna biru kehijauan yang khas. Serapan masing-masing konsentrasi larutan glukosa diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 630 nm. (Senyawa anthrone 9,10-dihydro-9-oxanthracene merupakan hasil reduksi anthraquinone, larutan anthrone= 1g anthrone dalam 1 l larutan 76% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dibuat waktu akan digunakan). Berat pati diperoleh dengan mengalikan berat glukosa dengan faktor koreksi 0,9 sebagai berikut:

$$\% \text{ Pati} = \frac{A}{S} \times \frac{fp}{W} \times 100 \times 0,9$$

Keterangan: A = Absorbansi sampel  
 S = Kemiringan kurva (slope)  
 fp = Faktor pengenceran  
 W = Berat sampel

Larutan standart dibuat dengan cara glukosa standar sebanyak 0,2 g dilarutkan dalam 100 mL aquades sehingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm. Larutan kemudian diencerkan dengan aquades sehingga diperoleh konsentrasi 0 (kontrol), 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm. Masing-masing larutan tersebut kemudian ditambah dengan 5 mL pereaksi *Anthrone*, kemudian ditutup dan

dicampur secara merata. Setelah ditempatkan dalam penangas air (*water bath*) 100°C selama 12 menit, dan didinginkan dengan air mengalir, kemudian dilakukan pembacaan absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dan dibuat hubungan antara absorbansi dengan mg glukosa.

- c. Konsentrasi gula reduksi dengan Metode Nelson-Somogy (Apriantono dkk., 1989; Sudarmadji dkk., 1997)

Larutan glukosa standard (10 mg glukosa anhidrat/ 100 ml) dibuat, dari larutan glukosa standard tersebut dilakukan 5 pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mg per 100 ml. Tabung reaksi yang bersih dipersiapkan, masing-masing tabung reaksi diisi dengan 1 ml larutan glukosa standard. Satu tabung reaksi diisi dengan 1 ml aquades sebagai blanko. Tabung reaksi yang sudah berisi larutan glukosa standard kemudian ditambahkan masing-masing dengan 1 ml reagen Nelson dan dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit (Sudarmadji dkk., 1997).

Tabung reaksi setelah 20 menit diambil dan didinginkan dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C. Tabung reaksi yang sudah dingin kemudian ditambahkan dengan 1 ml reagen Arsenomolibdat dan digojog sampai semua endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  larut kemudian ditambahkan dengan 7 ml aquades dan digojog sampai homogen. *Optical density* (OD) dari masing-masing tabung diukur pada panjang gelombang 540 nm kemudian ditentukan persamaan garis berdasarkan OD dan konsentrasi larutan standar sebagai berikut:

$$Y = a + b(X)$$

Keterangan:

$Y$  = *optical density* (OD)

$X$  = kadar gula pereduksi

Larutan sampel proses sakarifikasi diambil dengan pipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel diperlakukan dan diukur nilai absorbansi sama dengan cara pembuatan kurva standar (Sudarmadji dkk.,1997). Kadar gula pereduksi sampel ditentukan dengan rumus  $Y = a + b(X)$  yang diperoleh dari pembuatan kurva standar.

Setelah didapatkan kadar total karbohidrat dan gula reduksi dapat ditung derajat konversi (*dextrose equivalent*/DE) dapat diperoleh jika konsentrasi gula pereduksi dan jumlah gula total telah diketahui. DE dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$DE = \frac{\text{Konsentrasi gula pereduksi}}{\text{Konsentrasi gula total}} \times 100\%$$

3. Hidrolisis pati (Modifikasi dan kombinasi Maemunah dan Ali, 2006; Purnama, dkk., 2013; Amin, dkk., 2014).

Pati biji durian sebanyak 18, 27, 36, 45 dan 54 g masing-masing dicampur dengan aquadest sebanyak 900 ml sehingga menjadi larutan pati dengan kadar 2, 3, 4, 5 dan 6% (b/v) dan dibuat tiga ulangan tiap perlakuan. Sampel dipanaskan pada waterbath pada suhu 95 °C selama 1 jam, kemudian diukur gula reduksi dan total karbohidrat sampel. Sampel didinginkan dan dilikuifikasi dengan menambahkan enzim alpha-amilase 0,005% (b/v) pada pH 6.0 suhu 60 °C selama 1 jam, kemudian diukur gula reduksi dan total karbohidrat sampel. Larutan kemudian didinginkan dan dilakukan sakarifikasi menggunakan katalis enzim

Glukoamilase sebanyak 0,12% (b/v) pada pH 4.6 suhu 40 °C selama satu jam, selanjutnya diukur gula reduksi dan karbohidrat total sampel. Kadar gula reduksi diukur dengan metode Nelson somogyi dan total karbohidrat diukur menggunakan metode *Anthrone*. Skema hidrolisis dapat dilihat pada Lampiran 4.

#### 4. Pembuatan medium untuk pertumbuhan *Zymomonas mobilis*

##### a. Medium nutrien agar (Jutono, dkk., 1980 dengan modifikasi)

Medium nutrien agar (NA) dapat dibuat dengan mencampurkan 1000 ml aquadest, 5 g pepton, 3 g *beef extract* dan ditambahkan 15 gram agar. Pelarutan bahan-bahan tersebut dilakukan pada suhu 100°C menggunakan *microwave* hingga didapatkan kondisi homogen, lalu didinginkan pada suhu 40 °C hingga mengeras. Pada pembuatan medium agar miring, medium yang telah dipanaskan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml. Tabung reaksi disimpan pada posisi miring hingga memadat. Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit.

##### b. Media sintetik untuk pertumbuhan *Zymomonas mobilis*

Media pertumbuhan *Zymomonas mobilis* dibuat dari terdiri dari glukosa 10% (b/v), *yeast extract* 1% (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% (b/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05% (b/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (b/v) (Ruanglek dkk., 2006). Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit.

#### 5. Uji kemurnian *Zymomonas mobilis*

##### a. Morfologi koloni (Cappuccino dan Sherman, 2001)

Biakan bakteri uji diambil sebanyak satu ose, di inokulasikan pada medium NA dengan metode *streak plate*, Biakan bakteri uji diambil dengan



menggunakan jarum enten, kemudian ditusukkan ke dalam medium NA tegak hingga 2/3 bagian tabung reaksi. Bakteri pada medium diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian masing masing koloni diamati warna, bentuk, tepi, elevasi, motilitas dan sifatnya terhadap udara.

b. Morfologi sel

Morfologi sel dapat diamati dengan 2 uji yaitu pengecatan gram dan pengecatan tahan asam atau Ziehl Neelsen. Pengecatan gram (Cappuccino dan Sherman, 2001) dilakukan dengan cara gelas benda dibersihkan secara aseptis dengan alkohol 70%, kemudian biakan bakteri diambil sebanyak satu ose dan dioleskan pada gelas benda. Setelah itu, pada gelas benda ditetaskan larutan *Crystal violet* (Gram A) dan didiamkan selama satu menit, kemudian gelas benda dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan *hair dryer*. Kemudian pada gelas benda ditetaskan larutan Iodin mordant (Gram B) dan didiamkan selama satu menit, selanjutnya dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan *hair dryer*. Alkohol 95 % (Gram C) ditetaskan pada gelas benda dan didiamkan selama 30 detik lalu dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan *hair dryer*. Larutan safranin (Gram D) ditetaskan ke gelas benda dan didiamkan selama 2 menit, kemudian gelas benda dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan *hair dryer*. Gelas benda diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 100 (1000) kali dan didokumentasikan.

Uji pengecatan *Ziehl Neelsen* dilakukan dengan cara biakan *Zymomonas mobilis* diambil sebanyak 1 ose kemudian diletakkan di atas gelas benda. Cat Zn A ditetaskan di atasnya dan dibiarkan selama 1 menit kemudian preparat

dicuci dengan aquades dan dikeringanginkan. Cat Zn B kemudian ditetaskan dan dibiarkan selama 30 detik kemudian dicuci dan dikeringanginkan. Cat Zn C ditetaskan di atas preparat dan dibiarkan selama 30 detik kemudian dicuci dan dikeringanginkan. Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x100 (1000) kali. Gambar perbesaran mikroskop didokumentasikan dan diperhatikan bentuk, warna sel dan reaksi pengecatan, bakteri bersifat *acid fast* tampak berwarna merah dan yang non *acid fast* tampak berwarna biru (Jutono dkk., 1980 dengan modifikasi).

c. Uji sifat biokimia (Cappuccino dan Sherman, 2001)

Uji biokimia dilakukan dengan beberapa uji seperti uji fermentasi karbohidrat, uji katalase, uji reduksi nitrat, uji pembentukan indol, dan uji amilase. Pada uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan cara biakan bakteri uji diambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan ke medium laktosa, glukosa dan sukrosa cair yang terdapat pada tabung reaksi yang berisi tabung *Durham*. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam, setelah itu dilakukan pengamatan perubahan warna medium dan terbentuk atau tidaknya gelembung pada tabung *Durham*.

Uji katalase dilakukan dengan cara gelas benda dibersihkan secara aseptis dengan alkohol 70%, kemudian biakan bakteri uji diambil sebanyak satu ose dan dioleskan pada gelas benda. Larutan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) ditetaskan pada gelas benda dan diamati ada tidaknya gelembung udara yang terbentuk.

Uji reduksi nitrat dilakukan dengan cara biakan bakteri uji diambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan ke medium nitrat agar miring. Medium diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Larutan asam sulfanilat dan  $\alpha$ -naftalamin ditambahkan ke medium masing-masing sebanyak satu ml, kemudian digojok. Hasil positif pada uji reduksi nitrat adalah dengan perubahan warna medium menjadi warna merah. Medium nitrat dibuat dengan cara melarutkan medium nitrat bubuk sebanyak 9 gram (Difco™ Nitrate Broth) ke dalam aquadest sebanyak 1 liter. Kedalam medium ditambahkan agar sebanyak 1% dari volume total. Reagen asam sulfanilat dibuat dengan cara melarutkan 0,8 gram asam sulfanilat ke dalam 100 mL asam sulfat 0,2N. Reagen  $\alpha$ -naftalamin dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram  $\alpha$ -naftalamin ke dalam 100 mL asam sulfat 0,2N.

Uji pembentukan indol dapat dilakukan dengan cara biakan bakteri uji diambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan pada medium SIM dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Reagen Kovac's ditambahkan secara perlahan melalui dinding tabung reaksi hingga terbentuk garis pemisah antara reagen dan medium. Medium didiamkan dan diamati, hasil positif dari uji pembentukan indol adalah dengan terbentuknya cincin (garis pemisah) berwarna merah. Medium SIM dibuat dengan cara melarutkan 30 gram medium SIM (20 gram tryptone 20, 6,1 gram pepton, 0,2 gram ammonium sulfat, dan 3,5 gram sodium thio sulfat) ke dalam 1 liter aquadest. Reagen Kovac's dibuat dengan cara melarutkan 5 gram para dimetil amino benzaldehit, 75 ml amil alkohol dan 25 ml asam klorida.

Uji amylase dilakukan dengan cara menanam kultur bakteri uji pada medium *Muller Hinton Agar Plate* dengan pemulasan pada 1 tempat/titik, kemudian di inkubasi pada 37 °C selama 24 jam. Medium bakteri uji kemudian digenangi dengan lagol/iodium 1% selama 1-2 menit. Uji positif dengan terbentuk zona bening/bersih disekitar koloni. Medium *Muller Hinton Agar Plate* dibuat dari pencampuran 300 gram *beef extract*, 17,5 gram kasein hidolisat, 1,5 gram pati (*starch*) dan 17 gram agar pada pH  $7,4 \pm 0,2$ . Dari campuran diambil sebanyak 38 gram untuk dilarutkan ke dalam 1 liter aquadest, kemudian disterilisasi autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

#### 6. Profil pertumbuhan *Zymomonas mobilis* pada medium sintetik

Pengamatan sel *Zymomonas mobilis* dilakukan dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000 kali untuk mengetahui bentuk dan sifat motilitasnya, yaitu dengan membuat preparat basah *Zymomonas mobilis* (Cappucino dan Sherman, 2005). Profil pertumbuhan *Zymomonas mobilis* diketahui dengan menumbuhkan 10% (v/v) kultur pada media sintetik yang terdiri dari glukosa 10% (b/v), *yeast extract* 1% (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% (b/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05% (b/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (b/v) (Ruanglek dkk., 2006). Pertumbuhan sel (OD) diamati dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 560 nm setiap 4 jam selama 24 jam. Nilai OD menyatakan jumlah sel yang tumbuh dalam medium sintetik.

#### 7. Pembuatan kultur stok *Zymomonas mobilis*

Inokulum ditumbuhkan dalam 10 mL medium sintetik (Ruanglek dkk., 2006), diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Media pertumbuhan cair

sebanyak 10 ml yang berisi kultur digoreskan pada media pertumbuhan agar miring (Ruanglek dkk., 2006), diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Stok kultur agar miring disimpan dalam lemari es suhu 2-3 °C, diregenerasi tiga minggu sekali.

8. Pembuatan *Starter* (Ernes, dkk., 2014).

Kultur starter *Zymomonas mobilis* dibuat dengan menumbuhkan 1-2 ose kultur dari agar miring pada 10 mL media pertumbuhan cair (media sintetik) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C. 10 mL media pertumbuhan cair yang berisi kultur ditransfer pada 90 mL media pertumbuhan cair pada erlenmeyer 250 mL serta diinkubasi selama 16 jam pada suhu 30 °C dan goyangan 105 rpm.

9. Fermentasi dengan *Zymomonas mobilis*.

Larutan hidrolisat (hasil hidrolisis dengan gula reduksi paling tinggi) 2, 3, 4, 5, dan 6 % (b/v) dipersiapkan untuk digunakan dalam fermentasi etanol. Pada masing-masing konsentrasi ditambahkan nutrisi tambahan yaitu gula pasir 4% (b/v), *yeast extract* 1% (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% (b/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05% (b/v), dan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (b/v). Starter ditambahkan sebanyak 10% (v/v) ke dalam botol fermentor dan diinkubasi dengan lama sesuai dengan rancangan penelitian (0, 1, 2, 3, 4, dan 5 jam) pada suhu kamar. Untuk proses fermentasi 0 hari langsung melalui tahap pasteurisasi. Setelah proses fermentasi selesai, tutup botol dilepas dan dipasteurisasi pada suhu  $\pm 80^\circ\text{C}$  selama 10 menit (Kusumaningati, dkk., 2013). Dilakukan pengukuran kadar gula reduksi, pH medium pertumbuhan dan kadar etanol.

10. Analisis kadar etanol metode *Micro Conway Diffusion* (Widiyaningrum, 2009; Kartika, dkk., 1992; Sandi dan Zubaidah, 2014).

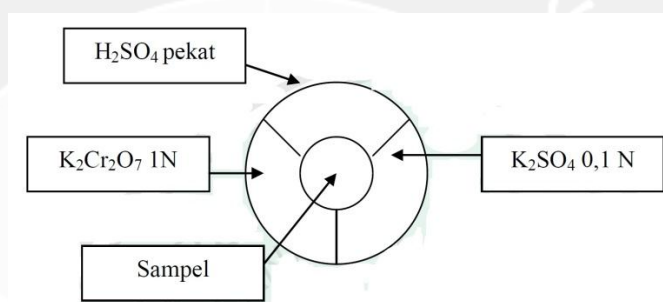
a. Pembuatan pereaksi

Larutan  $K_2CO_3$  Jenuh dibuat dengan cara melarutkan 465 gram Kristal  $K_2CO_3$  ke dalam aquadest sebanyak 300 mL, kemudian diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Larutan didinginkan, disaring dan dimasukkan ke dalam botol. Larutan  $K_2CrO_7$  dibuat dengan cara melarutkan 5,904 gram kristal  $K_2CrO_7$  pada labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas. Larutan  $K_2CrO_7$  disimpan pada lemari es, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 1 L.  $H_2SO_4$  ditambahkan secara perlahan sebanyak 278 mL, kemudian aquadest ditambahkan sampai tanda batas. Larutan blanko dibuat dengan cara mengambil 1 mL larutan  $K_2CO_3$  jenuh ditambahkan larutan  $K_2CrO_7$  asam sebanyak 1 mL, kemudian diencerkan dengan aquadest sampai 10 mL. Larutan standart dibuat dengan cara mengencerkan etanol absolut hingga diperoleh konsentrasi 0,025%, 0,050%, 0,075%, dan 0,1%. Larutan cuplikan (cairan hasil fermentasi pati biji durian) dipersiapkan 1 mL. Larutan cuplikan diencerkan dengan aquadest pada labu ukur sampai 100 mL.

b. Penentuan panjang gelombang maksimal larutan standar

Etanol standar dengan konsentrasi 0,025% v/v sebanyak 1 mL direaksikan dengan  $K_2CO_3$  jenuh sebanyak 1 mL di dalam unit Conway yang bagian tengahnya sudah berisi 1mL  $K_2CrO_7$  dan ditutup rapat, Keterangan cawan Conway dapat dilihat pada Gambar 5. Cawan diinkubasi selama 1-2 jam

pada suhu 40 °C dan akan terbentuk larutan berwarna hijau dan bau asetaldehid. Larutan yang terdapat di tengah Cawan dipipet dan dibilas dengan aquadest, kemudian diencerkan hingga 10 mL. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-500 nm dan dicari panjang gelombang dengan serapan maksimum. Pada penelitian ini, panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum adalah 470 nm.



Gambar 5. Posisi dan keterangan bahan pereaksi pada cawan Conway.

c. Penentuan kurva larutan standar alkohol (etanol)

Larutan standar yang telah dibuat dan diuji kualitatif (berwarna hijau dan berbau asetaldehid) diambil sebanyak 1 mL, kemudian diukur serapan (absorbansi) pada panjang gelombang maksimum (470 nm). Data yang diperoleh dari spektrofotometer pada larutan standar dibuat kurva hubungan antara absorbansi dan konsentrasi hingga didapatkan garis regresi. Persamaan garis regresi dengan 1 variabel dapat ditulis sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

Dengan ketentuan:

$$a = \frac{\sum xy}{\sum x^2} ; \text{dimana: } y = Y - \bar{Y}, \text{ dan } x = X - \bar{X}$$

$$\sum xy = \sum XY - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{n}$$

$$\sum x^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}$$

$$\sum y^2 = \sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}$$

Keterangan: X = Kosentrasi etanol  
Y = Absorbansi  
a = Koefisien arah  
b = Intersep

d. Penentuan kadar etanol cuplikan (sampel)

Larutan cuplikan sebanyak 1 mL direaksikan dengan  $K_2CO_3$  jenuh sebanyak 1 mL di dalam unit Conway yang bagian tengahnya sudah berisi 1 mL  $K_2CrO_7$  dan ditutup rapat. Cawan diinkubasi selama 1-2 jam pada suhu 40 °C dan akan terbentuk larutan berwarna hijau dan bau asetaldehid. Cuplikan diencerkan dengan aquadest samapi 10 mL. Larutan cuplikan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 470 nm. Kadar etanol cuplikan dari pengukuran absorbansi didistribusikan ke dalam persamaan  $Y = aX + b$  sehingga kosentrasi alkohol dalam cairan fermentasi pati biji durian dapat ditentukan sebagai berikut:

$$y = ax + b; \quad Ax = aX + b$$

$$X = \frac{Ax-b}{a}$$

Keterangan: X = Kosentrasi etanol  
Y = Ax = Absorbansi  
a = Koefisien arah  
b = Intersep

Pengukuran kadar etanol % b/v dalam cuplikan dihitung dengan memperhatikan faktor pengenceran dan densitas etanol dngan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar etanol \% b/v} = X \cdot fp \cdot \rho_{C_2H_5OH}, \text{ atau}$$



$$\text{Kadar etanol \%} = \frac{\text{Absorbansi cuplikan} + 0,0124}{0,02837 \times \text{mL cuplikan} \times 1000} \times 100 \times \text{fp}$$

Keterangan: X = Konsentrasi larutan cuplikan (% v/v)

fp = faktor pengenceran

ρ = Densitas etanol (0,789 g/mL).

#### 11. Perhitungan jumlah sel

Perhitungan jumlah sel dengan *colony counter* (de Idris, dkk., 2012):

Sebanyak 1 mL cairan fermentasi diencerkan secara bertingkat sampai  $10^{-8}$  mL. 1 mL hasil pengenceran dituangkan ke petridish kosong, lalu diputar-putar diatas meja sampai larutan merata didalam petridish. Kemudian ditambahkan  $\pm 15$  mL medium PCA (*Plate Count Agar*) kedalam petridish, lalu dihomogenkan dengan memutar-mutar petridish diatas meja. Petridish diinkubasi selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan alat *colony counter*.